

6 周较对照组显著升高,较 4 周下降。8 周较 6 周有显著下降,与对照组无显著差异。这与张立英等研究发现的在四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化中,BMP-7 的表达随着时间和纤维化程度的加重而减少相符合,考虑 BMP-7 可能参与肝纤维化的发生、发展过程,并与肝纤维化的严重程度密切相关。研究表明 BMP-7 可以减少肿瘤坏死因子 α 刺激产生的多种促炎性因子表达,如 IL-6、IL-1、单核细胞趋化蛋白 1、IL-8、内皮素 2 和结缔组织生长因子的表达,以起到抗炎作用^[8]。实验显示 BMP-7 在 DMN 造模早期出现下降,考虑可能与炎症早期肝细胞急性损伤时 BMP-7 大量消耗以减少炎症因子的释放,减轻炎症反应造成的实质细胞损伤有关。

肝纤维化是慢性肝脏疾病的共同病理表现,存在复杂的细胞因子网路调控。随着分子生物学的进展,BMP-7 的细胞和分子机制已是世界研究热点,但到目前为止尚未完全明了。许多研究表明 BMP-7 通过 Smad 途径从基因水平直接拮抗 TGF- β 的作用。本实验结果表明,BMP-7 参与肝纤维化的发生、发展过程,但 BMP-7 影响 TGF- β /Smad 通路的具体作用位点,拮抗肝纤维化的具体机制尚需值得进一步探索,有待于我们更多的研究。

参考文献

- 1 Tsukada S,Parsons CJ,Rippe RA. Mechanisms of liver brosis [J]. Clinica Chimica Acta,2006,364(1-2):33-60
- 2 Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy [J]. Gastroenterol,1997,32(3):424-430
- 3 Heldin CH,Miyazono K. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. Nature,1997,390(6659):465-471
- 4 Weiskirchen R,Meurer SK,Gressner OA,et al. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis [J]. Front Biosci,2009,14:4992-5012
- 5 Chen D,Zhao M,Mundy GR. Bone morphogenetic proteins [J]. Growth Factors,2004,22(4):233-241
- 6 Wang SE,Wu FY,Shin I,et al. Transforming growth factor β (TGF- β)-Smad target gene protein tyrosine phosphatase receptor type kappa is required for TGF- β function [J]. Mol Cell Bio1,2005,25(11):4703-4715
- 7 Schnabl B,Kweon YO,Frederick JP,et al. The role of Smad in mediating mouse hepatic stellate cell activation [J]. Hepatology,2001,34:89-110
- 8 Gould SE,Day M,Jones SS,et al. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells [J]. Kidney Int,2002,61(1):51-60
- 9 Marumo T,Hishikawa K,Yoshikawa M,et al. Epigenetic regulation of BMP7 in the regenerative response to ischemia [J]. J Am Soc Nephrol,2008,19(7):1311-1320 (收稿:2011-05-13)
(修回:2011-05-26)

高血糖对成骨细胞增殖分化影响的实验研究

梁军波 徐春丽 潘伟波 江玲军 陈海嘤

摘 要 **目的** 观察糖尿病大鼠股骨成骨细胞的病理改变以及高糖对成骨细胞增殖分化能力的影响,为临床治疗糖尿病骨质疏松症提供一定的实验基础。**方法** 2 月龄雄性 SD 大鼠 20 只,随机分正常对照组和糖尿病骨质疏松组($n=10$),糖尿病组大鼠经腹腔注射链脲佐菌素造模,同时体外分离培养成骨细胞,随机分为正常培养基组和高糖培养基组。成模 6 周麻醉后处死大鼠,分离各组大鼠的左侧股骨,于小动物放射成像系统上,测其近段骨密度,HE 染色右侧股骨,观察比较两组大鼠股骨成骨细胞、破骨细胞的形态。同时两组成骨细胞各自培养 48h 后检测其形态及 ALP 阳性率。**结果** 糖尿病组大鼠股骨骨密度显著低于对照组,同时骨皮质下成骨细胞显著减少,骨细胞呈扁平或星形,少见新骨形成。而高糖培养组成骨细胞其碱性磷酸酶(ALP)阳性率明显低于正常培养组,增殖分化能力减弱。**结论** 高血糖状态下成骨细胞减少及增殖分化能力减弱,造成成骨细胞和破骨细胞的失衡,从而影响了骨组织的代谢,可能是造成糖尿病骨质疏松症的一个原因。

关键词 糖尿病 骨质疏松 成骨细胞

Experimental Study of Effects of Hyperglycaemia on Osteoblast Proliferation and Differentiation. Liang Junbo,Xu Chunli, Pan Weibo, Jiang Lingjun,Chen Haixiao. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To study the osteoblasts pathological changes in femur bone and study the effect of hyperghycaemia on proliferation and differentiation of osteoblasts,providing experimental basis for the clinical treatment of diabetic osteoporosis. **Methods** Two

作者单位:317000 临海,浙江省台州医院骨科

通讯作者:陈海嘤,电子信箱:liangjunbo1972@163.com

months old male SD 20 rats were randomly divided into normal control group and diabetic osteoporosis group ($n = 10$). Diabetic rats were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin, while osteoblasts cultured in vitro, and were divided into normal medium group and high glucose medium group. After 6 weeks, the rats were anesthesia and left femur was isolated. The bone mineral density of proximal were measured by small animal radiography systems. The pathological changes of osteoblasts and osteoclasts were observed by HE staining. The morphology and ALP-positive rate of osteoblasts in two groups were detected after 48h culture. **Results** The bone mineral density in diabetic group was significantly lower than that of the control group, while the osteoblasts under cortical bone were significant reduced, bone cells were flat or star, and rare new bone formation was seen. The alkaline phosphatase (ALP) of osteoblasts cultured in high glucose were significantly lower than the normal culture group. Proliferation and differentiation were also weakened. **Conclusion** Under hyperglycaemia condition, the osteoblast proliferation and differentiation was reduced and weaken, resulting in osteoblasts and osteoclasts imbalance, which effects the metabolism of bone tissue, and may be the cause of diabetic osteoporosis.

Key words Diabetes; Osteoporosis; Osteoblast

糖尿病性骨质疏松症(diabetic osteoporosis)是糖尿病(diabetes mellitus)患者常见的慢性并发症之一,糖尿病骨质疏松症患者存在骨量减少,骨密度降低,骨组织结构受损等病变,因此易导致病理性骨折,致残率高,给糖尿病患者和社会造成很大的负担,虽然目前对其发病机制的研究正不断深入,但确切发病机制迄今尚未完全阐明^[1,2]。

成熟骨组织主要依靠持续循环性的破骨和成骨过程,由破骨细胞和成骨细胞协同完成。为此我们有理由推测高血糖状态下,存在成骨细胞的增殖分化障碍而致上述循环被破坏,并最终导致糖尿病骨质疏松的发生。碱性磷酸酶是成骨细胞主要功能活性酶,富含于胞质中,它可分解有机磷酸,增加局部无机磷酸的浓度,促进成骨细胞的矿化^[3]。本实验拟通过制作糖尿病大鼠模型,观察糖尿病大鼠股骨近端的骨密度,以及成骨细胞和破骨细胞的病理改变,同时研究高糖培养条件下成骨细胞中碱性磷酸酶的表达情况,探讨高血糖状态下成骨细胞形态和增殖分化与糖尿病大鼠骨质疏松的关系。

材料与方法

1. 模型制作和分组:体重 180 ~ 200g SD 雄性大鼠由浙江大学实验动物中心培育,随机分成正常对照组和糖尿病组,其中糖尿病组大鼠适应性饲养 3 天后禁食 12h,腹腔一次性注射链脲佐菌素(STZ)(美国 SIGMA 公司)65mg/kg,72h 后尾静脉测血糖, > 16.7mmol/L 为造模成功,正常对照组以等量枸橼酸钠缓冲液腹腔注射。喂养条件两组一致。每周测量血糖 1 次,尿糖 1 次。

2. 骨质疏松相关指标及形态学观察:上述大鼠喂养 6 周后,采用 1% 戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射,充分麻醉后打开腹腔,快速开胸暴露心,经 4% 多聚甲醛固定液灌注后,分离各组大鼠的左侧股骨,于小动物放射成像系统(faxitron modelmx20)上,测其近段骨密度。同时取右侧股骨内髁,置于 4% 多聚甲醛固定液固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋。HE 染

色,在显微镜下观察比较糖尿病模型组和正常大鼠成骨细胞、破骨细胞的形态。

3. 成骨细胞培养并检测:取出生 24h 内的 SD 大鼠的颅骨,彻底剥离骨膜后置入含 DMEM 培养液的培养皿中修剪成 1mm³ 大小的骨片。加入胰酶振荡消化(37℃, 2 ~ 3min), 15% 胎牛血清 DMEM 终止消化,吹打细胞,收集消化液,离心 10min (4℃, 1000r/min), 沉淀细胞置于含 15% 胎牛血清 DMEM 培养基和 PEST(青霉素 100U/ml, 链霉素 100μg/ml) 的培养皿内,并以约 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养瓶中,培养箱内培养(37℃, 5% CO₂), 每 2 ~ 3 天换液 1 次。使用第 3 代细胞随机分为正常培养基组和高糖培养基组(葡萄糖浓度 100mmol/L), 分别培养 48h 后,将贴壁细胞用 40g/L 多聚甲醛固定,而后 PBS 洗涤 3 次,按比例配制 BCIP/NBT 染色工作液,48 孔板每孔加 100μl 上述 BCIP/NBT 染色液,室温避光孵育 5 ~ 30min,直至显色至预期深浅,去除工作液,用蒸馏水洗涤终止显色。在 100 ~ 200 倍倒置显微镜下,计数各组细胞 ALP 染色阳性率。

4. 统计学方法:采用 UTHSCSA Image Tools 3.0(美国德克萨斯大学医学院开发)图像分析处理系统进行分析 and 统计单位面积阳性细胞数,数据处理采用 SPSS 16.0,两组间均数比较采用 *t* 检验,两组阳性率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 体质量和血糖的检测结果:成模前两组大鼠的体重和血糖差异无统计学意义,成模 6 周后发现糖尿病大鼠体重明显减轻,同时伴血糖升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 两组大鼠成模前后体质量、血糖浓度水平的影响

组别	成模前		成模后 6 周	
	体重(g)	血糖 (mmol/L)	体重(g)	血糖 (mmol/L)
正常对照组	166.3 ± 6.3	4.7 ± 0.6	361.5 ± 22.1	4.8 ± 0.6
糖尿病组	167.2 ± 6.9 [*]	4.6 ± 0.5 [*]	196.3 ± 32.4 [#]	24.3 ± 4.5 [#]

与正常对照组比较, ^{*} $P > 0.05$; 与正常对照组比较, [#] $P < 0.05$

2. 骨组织的密度及病理变化: X 线显示糖尿病组大鼠股骨骨皮质变薄, 骨小梁稀疏, 骨密度明显比正常对照组大鼠下降(图 1)。

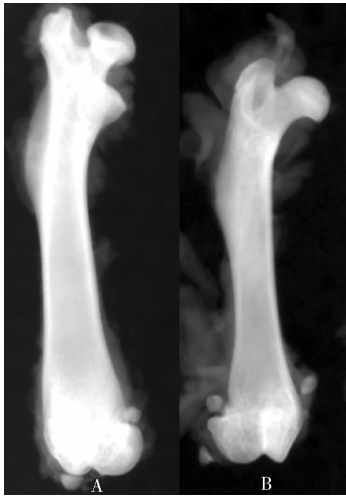


图 1 两组大鼠左侧股骨 X 线观察图
A. 正常对照组; B. 糖尿病组

正常组大鼠股骨 HE 染色结果表明, 软骨下区骨小梁未见吸收或断裂现象, 成骨细胞胞质细密, 形状与骨陷窝一致, 软骨下区可见新骨形成, 破骨细胞少见。糖尿病大鼠股骨则见骨皮质下成骨细胞显著减少, 成骨细胞呈扁平或星形, 核固缩, 形状与骨陷窝不一致, 少见新骨形成。破骨细胞生长活跃, 空骨陷窝明显增多。骨小梁排列稀疏, 结构紊乱(图 2)。

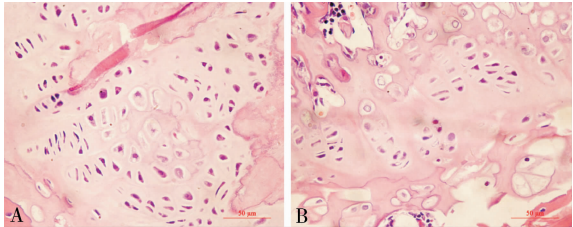


图 2 两组大鼠股骨 HE 染色观察(HE, ×400)
A. 正常对照组; B. 糖尿病组

3. 培养成骨细胞形态学观察及 ALP 染色结果: 图 3 可见正常培养组成骨细胞可见大部分细胞贴壁生长, 细胞形状呈多边形、梭形、细胞伸出较多突起, 有的突起相互连接, 而高糖培养组成骨细胞不能伸展开, 核轮廓不清晰, 生长较为分散, 碱性磷酸酶染色阳性部位呈紫色细颗粒状, 各成骨细胞染色深浅不等, 高糖培养组成骨细胞碱性磷酸酶染色呈浅蓝色, 其 (ALP) 阳性率为 80.9%, 显示其增殖分化能力减弱, 而正常培养基组呈深蓝色, 其阳性率为 94.6%, 两组

差异有统计学意义($P < 0.05$)。

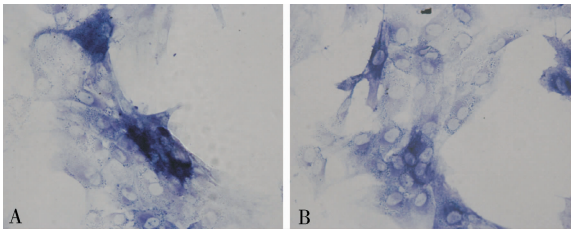


图 3 两组成骨细胞培养 ALP 染色 (ALP, ×400)
A. 正常成骨细胞; B. 高糖培养成骨细胞

讨 论

流行病学研究发现, 糖尿病患者由于代谢紊乱, 普遍伴发骨质疏松症状, 如 X 线骨密度仪检测发现 30.4% 糖尿病患者可出现脊柱或髋骨的骨质疏松, 同时约 14% ~ 20% 患者可出现骨质疏松症状, 其 X 线检查可以观察到骨皮质变薄, 骨小梁数量稀疏、紊乱, 并随年龄增加而呈快速上升趋势^[4,5]。本研究显示大鼠股骨 X 线片出现骨皮质变薄, 骨密度降低等症, 同时 HE 染色显示骨细胞呈扁平或星形, 胞质嗜碱性, 细胞器不发达, 少见新骨形成。空骨陷窝明显增多。骨小梁排列稀疏、变细变薄等明显的骨质疏松病理改变。大量研究表明, 糖尿病骨质疏松症除与性别、年龄、糖尿病病程等因素有关外, 糖尿病患者胰岛素不足、胰岛素生长因子-1 (IGF-1) 缺乏、晚期糖基化终末产物 (AGEs) 积累等因素都可以促进糖尿病骨质疏松症的发生、发展^[6,7], 成熟骨组织主要靠持续、循环性的破骨和成骨过程, 由破骨细胞和成骨细胞协同完成。本研究结果提示, 正常培养组成骨细胞贴壁生长, 细胞伸出较多突起, 有的突起相互连接, 而高糖培养组成骨细胞不能伸展开, 生长分散, 同时碱性磷酸酶染色阳性率亦降低, 显示其增殖分化能力减弱, 显示高血糖状态下成骨细胞减少及增殖分化能力减弱, 造成成骨细胞和破骨细胞的失衡, 从而影响了骨组织的代谢, 可能是造成糖尿病骨质疏松症的一个原因。

综上所述, 本研究结果显示糖尿病大鼠存在软骨下区成骨细胞核固缩、减少而破骨细胞生长活跃, 骨小梁排列稀疏等明显的骨质疏松病理改变, 同时成骨细胞内碱性磷酸酶染色阳性率亦明显降低, 初步阐明了高血糖状态下成骨细胞减少及增殖分化能力减弱, 造成成骨细胞和破骨细胞的失衡, 从而影响了骨组织的代谢, 为糖尿病性骨质疏松症的深入研究提供了一定实验基础和依据。

参考文献

- 1 Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future [J]. *Lancet*, 2011, 377 (9773): 1276 – 1287
- 2 Yaturu S. Diabetes and skeletal health [J]. *J Diabetes*, 2009, 1 (4): 246 – 254
- 3 钟卫权. 不同负荷的游泳运动及雌激素对去卵巢大鼠血清 IL-6、TGF- β 1 水平及生化指标的影响 [J]. *医学研究杂志*, 2008, 37 (12): 86 – 88
- 4 牛银玲, 邵小英. 糖尿病性骨质疏松 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13 (2): 138 – 140
- 5 Shan PF, Wu XP, Zhang H, *et al.* Age-related bone mineral density, osteoporosis rate and risk of vertebral fracture in mainland Chinese women with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Endocrinol Invest*, 2011, 34 (3): 190 – 196
- 6 Fritton JC, Kawashima Y, Mejia W, *et al.* The insulin-like growth factor-1 binding protein acid-labile subunit alters mesenchymal stromal cell fate [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (7): 4709 – 4714
- 7 Merlotti D, Gennari L, Dotta F, *et al.* Mechanisms of impaired bone strength in type 1 and 2 diabetes [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010, 20 (9): 683 – 690

(收稿: 2011-06-18)

(修回: 2011-07-07)

RhIL-21 对 NK-92MI 细胞生物学活性的影响

郑 瑞 陈葆国 颜卫华 李伯利 章卫国 干灵红

摘 要 目的 探讨 rhIL-21 对 NK-92MI 细胞免疫功能的影响。方法 以不同浓度 (25 ~ 100 ng/ml) 的 rhIL-21 培养 NK-92MI 细胞 24 ~ 72 h, 观察 NK-92MI 细胞的增殖。以 50 ng/ml 的 rhIL-21 处理 NK-92MI 不同时间后, FACS 检测 NK-92MI 细胞的凋亡, NK-92MI 细胞表面 NKG2D 受体及胞内颗粒酶-B 蛋白的表达; 细胞杀伤试剂盒检测 NK-92MI 细胞对靶细胞 K-562 的细胞毒效应; RT-PCR 检测 NK-92MI 受体 NKG2D, 效应分子颗粒酶-B、穿孔素及细胞因子 IFN- γ 基因 mRNA 的表达; ELISA 检测其分泌 IFN- γ 的水平。结果 RhIL-21 虽能抑制 NK-92MI 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 但不会促进细胞的凋亡 ($P < 0.05$)。RhIL-21 能促进 NK-92MI 细胞穿孔素、IFN- γ 、颗粒酶-B、NKG2D 受体基因及相应蛋白质的表达上调 ($P < 0.05$)。rhIL-21 预处理组 NK-92MI 对 K-562 细胞的细胞毒效应也明显增强 ($P < 0.05$)。结论 RhIL-21 能增强 NK-92MI 细胞的细胞毒效应, IL-21 在肿瘤的免疫治疗中有潜在临床应用价值。

关键词 重组人白细胞介素-21 NK-92MI 细胞 干扰素- γ NKG2D 颗粒酶 穿孔素

Effect of rhIL-21 on NK-92MI Cells. Zheng Rui, Chen Baoguo, Yan Weihua, Li Boli, Zhang Weiguo, Gan Linghong. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the effect of rhIL-21 on NK-92MI cells. **Methods** Using in vitro cultural experiments, NK-92MI cells were treated with different concentration of rhIL-21 and then the proliferation were tested at different time. In addition, after NK-92MI cells treated with 50 ng/ml rhIL-21 for 48 h or 72 h, the NK-92MI cell activity, apoptotic cells, the expressions of NKG2D and granzyme-B was measured using FACS assay. The levels of IFN- γ from the supernatants were detected by ELISA. The expressions of NKG2D, perforin, granzyme-B, and IFN- γ mRNA were determined by RT-PCR. **Results** RhIL-21 inhibited NK-92MI cell proliferation. However, rhIL-21 did not affect cell apoptosis. RhIL-21 increased the expressions of the effector molecules granzyme-B and IFN- γ as well as activation receptor NKG2D at the mRNA and protein levels. Furthermore, compared with control, rhIL-21 enhanced the cytotoxicity of NK92-MI cells against K-562 target. **Conclusion** RhIL-21 could enhance the cytotoxicity of NK92-MI cells possibly by up-regulating the expression of activation and effector molecular, suggesting that IL-21 might have therapeutically effect to enhance NK cell-mediated antitumour responses.

Key words Recombination human interleukin 21 (rhIL-21); NK-92MI cells; Interferon- γ (IFN- γ); NKG2D; Granzyme-B; Perforin

IL-21 主要是由活化的 CD4⁺T 细胞和 NKT 细胞分泌, 属于 γ c (共同 γ 链) 细胞因子家族成员之

一^[1-3]。至今有不少关于白介素 (IL)-21 对鼠和人 NK 细胞生物学调节的研究。曾发现 IL-21 和 IL-15 体外共同培养的鼠 NK 细胞, 其增殖受到抑制, IL-21 也并非 NK 细胞早期成熟必须的细胞因子^[4]。IL-21 可以通过增强鼠 NK 细胞杀伤活性对 NKG2D